

## INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 28 May 1999 (28.05.99)	
International application No. PCT/EP98/06001	Applicant's or agent's file reference H26102PCT
International filing date (day/month/year) 21 September 1998 (21.09.98)	Priority date (day/month/year) 22 September 1997 (22.09.97)
Applicant MICULKA, Christian et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

21 April 1999 (21.04.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Jean-Marie McAdams
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/331 (July 1992)

2641207

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H26102PCT /ps	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/06001	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 21 September 1998 (21.09.98)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 22 September 1997 (22.09.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/50, 33/53, C12Q 1/68, C07K 1/04		
Applicant AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 21 April 1999 (21.04.99)	Date of completion of this report 14 December 1999 (14.12.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/06001

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1 - 17, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1 - 32, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/10 - 10/10, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	5-10, 14-16, 19-26, 30-31	YES
	Claims	1-4, 11-13, 17, 18, 27-29, 32	NO
Inventive step (IS)	Claims	5-10	YES
	Claims	1-4, 11-32	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-32	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

1). **Preamble**

1.1 According to the present claims, in particular independent Claim 1, the subject matter of the application is a recognition system. A person skilled in the art will see that this recognition system according to Claim 1 would be suitable for detecting the substrate S\*; consequently, the subject matter of Claim 1 does not exclude a "detector" probe for substrate S in the sense of a sandwich assay (see also "containing at least"); this can also be understood in the light of the present description (see page 10, section 3).

\*) with an immobilized binding component A and a (bifunctional) recognition species B as the capture probe for S, wherein the bond between A and B "is in the form of a molecular pairing system", i.e., via an intermolecular bond.

1.2 The application makes it clear that the present invention is based on the use of pyranosyl nucleic acids, primarily p-RNAs. Such structural variants have not been named in the prior art cited in the search report; see page 4, section 2, page 10, lines

14-17, Claims 5-9 of the present application.

2). **Box V.2**

2.1 Because of the sandwich assay disclosed in WO-A-95/07289 (**D6**), the recognition system according to Claim 1 and the subject matter of Claims 2-4, 11-13, 17, 18, 27-29 and 32 are not novel; see D6, Figure 1 and page 12, lines 15-26. This system from parts 10-15 appears to anticipate the subject matter of the claims mentioned (part 12 is bifunctional and corresponds to recognition species B).

2.2 A recognition system with a molecular pairing system (between a nucleic acid and its analogues) is also known from **D4** = WO-A-96/13522; see D4, page 4, from line 29; page 5, from line 31; page 12, lines 21-29. According to page 10, of the present application, the applicant appears to also recognize this. Use of such a supramolecular complex along with a substance library was known; cf. **D5** = WO-A-93/20242, e.g., Claims 19-21. Accordingly, a chemical structure appears to have been identified that binds with a biologically active molecule. The chemical structure is identified after isolation of the supramolecular complex formed between the chemical structure and the biologically active molecule. Such a procedure (with isolation) also appears to be implicit in the present application (see page 10, sections 2 and 3 and Claims 27 and 30).

The present application also fails to show that the use of pyranosyl nucleic acids (see above in 1.2) leads to unexpected effects in the claimed recognition system; compare the above with a system according to D4 and D5. As a consequence, the

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No.

PCT/EP 98/06001

subject matter of Claims 1-4 and 11-32 does not  
involve an inventive step.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/06001

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No.  
Patent No.

Publication date  
(day/month/year)

Filing date  
(day/month/year)

Priority date (valid claim)  
(day/month/year)

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure

Date of non-written disclosure  
(day/month/year)

Date of written disclosure  
referring to non-written disclosure  
(day/month/year)

See Supplemental Box

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI .

- 3) . Document **D1** = WO 97/43232, which does not belong to the present prior art, could become relevant in the regional phase with the EPO according to EPC Article 54(3); cf. D1, Claims 28, 32 and 6.



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

BÖSL, Raphael  
BARDEHLE PAGENBERG DOST ALTENBURG  
GEISSLER ISENBRUCK  
Galileiplatz 1  
D-81679 München  
ALLEMAGNE

Patent- u. Rechtsanwälte  
Galileiplatz 1, München

16. Dez. 1999

Frist  
Bear.

## PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG  
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNGSBERICHTS  
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

14. 12. 99

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
H26102PCT /ps

### WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP98/06001

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  
21/09/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  
22/09/1997

Anmelder

AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES... et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

#### 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

 Europäisches Patentamt  
D-80298 München  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Danti, B

Tel. +49 89 2399-8161



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts H26102PCT /ps	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06001	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 21/09/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/09/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/50		
Anmelder AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES... et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  21/04/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  4. 12. 99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Cuendet, P  Tel. Nr. +49 89 2399 8690 

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06001

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-17                      ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-32                      ursprüngliche Fassung

### Zeichnungen, Blätter:

1/10-10/10              ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,        Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	5-10, 14-16, 19-26, 30-31
	Nein: Ansprüche	1-4, 11-13, 17, 18, 27-29, 32
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	5-10
	Nein: Ansprüche	1-4, 11-32
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-32
	Nein: Ansprüche	

# **INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06001

---

## **2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

## **VI. Bestimmte angeführte Unterlagen**

### **1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)**

**und / oder**

### **2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)**

**siehe Beiblatt**

**1). Präambel**

1.1. Gemäss der vorliegenden Ansprüche, i.b. des unabhängigen Anspruchs 1, ist der Gegenstand der Anmeldung ein Erkennungssystem. Ein Fachmann erkennt, dass dieses Erkennungssystem gemäss Anspruch 1 sich zum Auffinden des Substrates S eignen würde\*; demzufolge schliesst der Gegenstand von Anspruch 1 eine "Detektor"-Probe für das Substrates S im Sinne eines Sandwich-Assays keineswegs aus (s. auch "enthaltend mindestens"); dies lässt sich auch im Lichte der vorliegenden Beschreibung verstehen (s.S.10, 3. Abschnitt).

---

\*)mit einer immobilisierten Bindungskomponente A und einer (bifunktionellen) Erkennungsspezies B als Capture-Probe für S, wobei die Bindung zwischen A und B "in Form eines molekularen Paarungssystems", d.h. über eine intermolekulare Bindung erfolgt

1.2. Aus der Anmeldung geht hervor, dass die vorliegende Erfindung auf der Verwendung von Pyranosyl-Nukleinsäuren vor allem p-RNA's basiert. Solche Strukturvarianten scheinen in dem im Recherchenbericht zitierten Stand der Technik nicht genannt zu sein; s. vorliegende Anmeldung S.4, 2. Abschnitt, S.10, Zeilen 14-17, Ansprüche 5-9.

**2). Punkt V.2.**

2.1. Das Erkennungssystem gemäss Anspruch 1 und der Gegenstand der Ansprüche 2-4, 11-13, 17, 18, 27-29 und 32 scheinen durch den in WO-A-95/07289 (D6) offenbarten Sandwich-Assay nicht neu zu sein; s. D6, Fig. 1 und Seite 12, Zeilen 15-26. Dieses System aus den Teilen 10-15 scheint den Gegenstand der genannten Ansprüche vorwegzunehmen (Teil 12 ist bifunktionell und entspricht der Erkennungsspezies B).

2.2 Ein Erkennungssystem mit einem molekularen Paarungssystem (zwischen einer Nukleinsäure und deren Analoga) geht auch aus D4: WO-A-96/13522 hervor; s. D4, S.4. ab Zeile 29; S.5, ab Zeile 31; S. 12, Zeilen 21-29. Gemäss Seite 10 der vorliegenden Anmeldung scheint der Anmelder dies auch anzuerkennen. Eine Verwendung eines solchen supramolekularen Komplexes unter Verwendung einer Substanzbibliothek war bekannt; vgl. D5: WO-A-

93/20242, z.B. Ansprüche 19-21. Demgemäss scheint eine chemische Struktur, die mit einem biologisch aktiven Molekül bindet, identifiziert zu werden. Nach der Isolierung des zwischen der chemischen Struktur und dem biologisch aktiven Molekül gebildeten supramolekularen Komplex wird die chemische Struktur identifiziert. Eine solche Vorgehensweise (mit Isolierung) scheint auch in der vorliegenden Anmeldung impliziert zu sein, s.S.10, Abschnitte 2+3 und Ansprüche 27/30.

In der vorliegenden Anmeldung wird auch nicht gezeigt, dass die Verwendung von von Pyranosyl-Nukleinsäuren (s. oben in 1.2.) im beanspruchten Erkennungssystem zu unerwarteten Effekten führt; dies im Vergleich zu einem System gemäss D4+D5. Demzufolge scheint der Gegenstand der Ansprüche 1-4 und 11-32 nicht erfinderisch zu sein.

3). **Punkt VI.**

Das Dokument **D1**: 97/43232 das (hier) nicht zum Stand der Technik gehört, könnte in der regionalen Phase vor dem EPA gemäss Art. 54(3) EPÜ relevant sein; vgl. D1, z.B. Ansprüche 28, 32 und 6.

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BARDEHLE, Heinz  
Galileiplatz 1  
D-81679 München  
ALLEMAGNEPatent- u. Rechtsanwälte  
Galileiplatz 1, München

01. FEB. 1999

Frist  
Bear.

Date of mailing (day/month/year)

22 January 1999 (22.01.99)

Applicant's or agent's file reference

H26102PCT

International application No.

PCT/EP98/06001

## IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

21 September 1998 (21.09.98)

1. The following indications appeared on record concerning:



the applicant



the inventor



the agent



the common representative

Name and Address

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT  
Brüningstrasse 50  
D-65929 Frankfurt am Main  
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:



the person



the name



the address



the nationality



the residence

Name and Address

AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES  
GMBH & CO. KG  
D-65926 Frankfurt am Main  
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:



the receiving Office



the designated Offices concerned



the International Searching Authority



the elected Offices concerned



the International Preliminary Examining Authority



other:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

N. Fischer

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

# PCT

## ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)  
(max. 12 Zeichen) H26102PCT

**Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG**  
Adressierbares modulares Erkennungssystem, seine Herstellung und Verwendung

### Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Hoechst Aktiengesellschaft  
Brüningstr. 50  
D-65929 Frankfurt am Main

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):  
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):  
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

### Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Miculka, Christian  
Gebeschusstr. 36  
65929 Frankfurt  
DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):  
AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat):  
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

### Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Bardehle, Heinz  
Dost, Wolfgang  
Altenburg, Udo  
Geissler, Bernhard  
Dehmel Albrecht  
Kahlhöfer, Hermann  
Pagenberg, Jochen  
Isenbruck, Günter  
Rost, Jürgen  
Bösl, Raphael  
Galileipl. 1 - 81679 München

Telefonnr.:

0049-89-928050

Telefaxnr.:

0049-89-92805444

Fernschreibnr.:

--

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER	
<i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.</i>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p>Windhab, Norbert Akazienstr. 28 65795 Hattersheim DE</p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p>Hoppe, Hans-Ulrich Amselweg 11 65929 Frankfurt DE</p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><input type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.</p>	

## Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

## Regionales Patent

- ☐ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ OA OAPI-Patent: BF BurkinaFaso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien                          | <input type="checkbox"/> LS Lesotho   |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien                          | <input type="checkbox"/> LT Litauen   |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich                        | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien             | <input type="checkbox"/> LV Lettland  |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan                      | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau                                 |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina               | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar                                      |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados                          | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien              | <input type="checkbox"/> MN Mongolei  |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien                         | <input type="checkbox"/> MW Malawi  |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus                           | <input type="checkbox"/> MX Mexiko  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada                 | <input type="checkbox"/> NO Norwegen  |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein  | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland                                      |
| <input type="checkbox"/> CN China                             | <input type="checkbox"/> PL Polen   |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba                              | <input type="checkbox"/> PT Portugal  |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik             | <input type="checkbox"/> RO Rumänien  |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland                       | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation                            |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark                          | <input type="checkbox"/> SD Sudan   |
| <input type="checkbox"/> EE Estland                           | <input type="checkbox"/> SE Schweden  |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien                           | <input type="checkbox"/> SG Singapur  |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland                          | <input type="checkbox"/> SI Slowenien                                       |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich            | <input type="checkbox"/> SK Slowakei  |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien                          | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone                                    |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana                             | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan                                   |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia                            | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan                                    |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau                     | <input type="checkbox"/> TR Türkei  |
| <input type="checkbox"/> HR Kroatien                          | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago                             |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn                            | <input type="checkbox"/> UA Ukraine   |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien                        | <input type="checkbox"/> UG Uganda  |
| <input type="checkbox"/> IL Israel                            | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika       |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan                  | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan                                      |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia                             | <input type="checkbox"/> VN Vietnam   |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan                       | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien                                     |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe  |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea                    |   |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan                        |   |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia                       |   |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka                         |   |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia                           |   |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

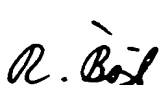
Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		national Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 22. September 1997 (22.09.1997)	19741716.7	DE		
Zeile (2)				
Zeile (3)				

☐ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) \_\_\_\_\_ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist/sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist).

\* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedsstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE	
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden)	Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche: Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist): Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)
ISA /	

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE: EINREICHUNGSSPRACHE	
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:	Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:
Antrag : 4	1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 17	2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
Ansprüche : 6	3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht: Aktenzeichen (falls vorhanden):
Zusammenfassung : 1	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
Zeichnungen : 10	5. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet: (1)
Sequenzprotokollteil der Beschreibung : --	6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
Blattzahl insgesamt : 38	7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.): 1	8. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren in computerlesbarer Form
	9. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten): V-Scheck
	Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: Deutsch

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS	
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.	
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-end;"> <div style="text-align: center;">   <b>Dr. Raphael Bösl</b>              Patentanwalt           </div> <div style="text-align: center;">             21. September 1998           </div> <div style="text-align: center;">             /ps           </div> </div>	

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen  <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen	
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro	

BEST AVAILABLE COPY

K

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

09/509057

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>H26102PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 98/ 06001</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>21/09/1998</b>
(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>22/09/1997</b>	
Anmelder <b>AVENTIS RESEARCH &amp; TECHNOLOGIES et al.</b>	

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
  - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde,
  - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
    - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
  - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
  - Abb. Nr. 1 ☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.
  - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
  - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

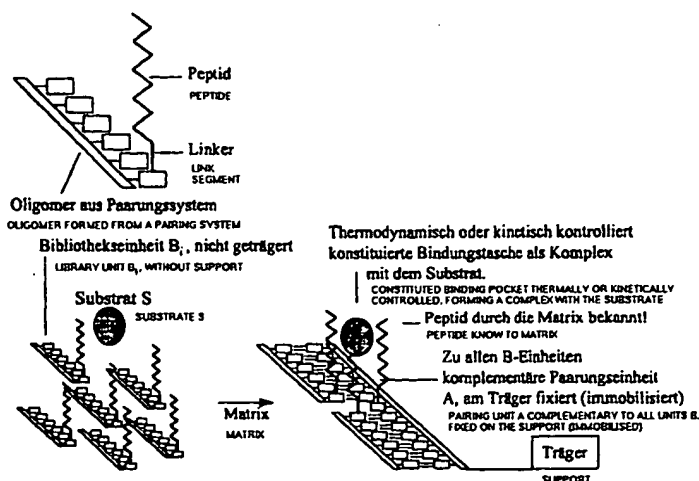


**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM.  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(15) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>G01N 33/50, 33/53, C12Q 1/68, C07K 1/04</b></p>	<b>A1</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/15893</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>1. April 1999 (01.04.99)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP98/06001</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>21. September 1998 (21.09.98)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten: <b>197 41 716.7      22. September 1997 (22.09.97)    DE</b></p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>AVENTIS RESEARCH &amp; TECHNOLOGIES GMBH &amp; CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).</b></p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>MICULKA, Christian [AT/DE]; Gebeschusstrasse 36, D-65929 Frankfurt am Main (DE). WINDHAB, Norbert [DE/DE]; Akazienstrasse 28, D-65795 Hattersheim (DE). HOPPE, Hans-Ulrich [DE/DE]; Amselweg 11, D-65929 Frankfurt am Main (DE).</b></p> <p>(74) Anwälte: <b>BARDEHLE, Heinz usw.; Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).</b></p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: <b>AU, BR, CA, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b></p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: ADDRESSABLE MODULAR RECOGNITION SYSTEM, PRODUCTION MODE AND USE

(54) Bezeichnung: ADRESSIERBARES MODULARES ERKENNUNGSSYSTEM, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG



(57) Abstract

The invention concerns a recognition system comprising (a) at least an immobilised binding constituent A and at least a binding site for the recognising species B and (b) at least a recognising species B capable of being fixed on the constituent A and at least a binding site for a substrate S, the binding of constituent A on the recognition species B intervening in the form of a molecular pairing system.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Erkennungssystem enthaltend (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bindestelle für die Erkennungsspezies B und (b) mindestens eine Erkennungsspezies B, die an die Bindungskomponente A binden kann und mindestens eine Bindestelle für ein Substrat S enthält, wobei die Bindung der Bindungskomponente A an die Erkennungsspezies B in Form eines molekularen Paarungssystems erfolgt.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

5

## Adressierbares modulares Erkennungssystem, seine Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Erkennungssystem enthaltend

- 10 (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bindestelle für die Erkennungsspezies B und
- (b) mindestens eine Erkennungsspezies B, die an die Bindungskomponente A binden kann und mindestens eine Bindestelle für ein Substrat S enthält, wobei die Bindung der Bindungskomponente A an die Erkennungsspezies B in Form eines molekularen Paarungssystems erfolgt.
- 15

Arrays sind Anordnungen von immobilisierten Erkennungsspezies, die speziell in der Analytik und Diagnostik eine wichtige Rolle bei der simultanen Bestimmung von Analyten spielen. Beispiele sind Peptide-Arrays (Fodor et al., Nature 1993, 364, 555) und Nucleinsäure-Arrays

20 (Southern et al. Genomics 1992, 13, 1008; U.S. Patent Nr. 5,632,957).

In der experimentellen Analytik lassen Arrays durch die lokalisierte Erzeugung von Ereignissen eine besonders einfache, schnelle und reproduzierbare Datenanalyse zu. Beispiele hierfür reichen vom physikalischen Mehrkanaldetektor bis hin zu Mikrotiterplatten in der Labormedizin.

25

Arrays dienen auch zur Speicherung und Verarbeitung von Informationen und sind das grundlegende Konstruktionselement der Nanotechnologie.

30 Weitere wichtige Anwendungsbereiche sind in der Biologie, Biochemie, Medizin und Pharmakologie zu finden. So wird in EP-A1-0 461 462 ein Immunoassay beschrieben, bei dem feldartig positionierte und immobilisierte Antigene mit einem oder mehreren Antikörpern in Kontakt gebracht werden. In WO 96/01836 wird beispielsweise ein Array von DNA-Molekülen unterschiedlicher Sequenz beschrieben, der zur Detektion von Genabschnitten

35 diente und so beispielsweise zur Diagnose pathogener Bakterien führte.

Immobilisierung durch supramolekulare Wechselwirkungen sind auch außerhalb der Array-Anwendungen bekannt. So können Träger mit Anti-Antikörpern über ein kovalent an den Träger gebundenes Antigen fixiert werden. Die Analytik von Immunoassays basiert weitgehend auf Enzym-Immunoassays (EIAs), bei denen eine enzymatisch katalysierte Reaktion die  
5 Präsenz eines Antigen-Antikörper- oder eines Antigen-Antikörper-Antiantikörper-Komplexes anzeigt. Eine der am Komplex beteiligten Einheiten ist hierbei entweder an einem Träger immobilisiert oder selbst ein Träger, z.B. in Form von Gewebsbestandteilen.

10 Derartige Signalverstärkungsverfahren haben jedoch insbesondere bezüglich der Verlässlichkeit der qualitativen Aussage wie auch der Quantifizierung Nachteile. Ein besonderer Nachteil von miniaturisierten Arrays sind der Aufwand und die Kosten bei der Herstellung.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein Erkennungssystem zu finden, das einfach,  
15 zuverlässig, hochselektiv und zudem billig ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Erkennungssystem enthaltend

- (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bindestelle für die Erkennungsspezies B und
  - 20 (b) mindestens eine Erkennungsspezies B, die an die Bindungskomponente A binden kann und mindestens eine Bindestelle für ein Substrat S enthält, wobei die Bindung der Bindungskomponente A an die Erkennungsspezies B in Form eines molekularen Paarungssystems erfolgt.
- 25 Solche Paarungssysteme sind supramolekulare Systeme nicht-kovalenter Wechselwirkung, die sich durch Selektivität, Stabilität und Reversibilität auszeichnen, und deren Eigenschaften bevorzugt thermodynamisch, d. h. durch Temperatur, pH-Wert und Konzentration beeinflusst werden. Solche Paarungssysteme können z. B. aufgrund ihrer selektiven Eigenschaften auch als „molekularer Klebstoff“ für die Zusammenführung von unterschiedlichen Metallclustern  
30 zu Cluster-Verbänden mit potentiell neuen Eigenschaften verwendet werden [siehe z. B. R. L. Letsinger, et al., Nature 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., Nature 1996, 382, 609-11].

Daher ist es besonders vorteilhaft, wenn das Paarungssystem einen Komplex darstellt, der durch Assoziation der Bindungskomponente A mit der Erkennungsspezies B über nicht-



kovalente Wechselwirkungen gebildet wird. Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen sind insbesondere Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Stapelungen („Stacking“), Metalligandierungen, Charge-Transfer-Komplexe und hydrophobe Wechselwirkungen.

5 In einer besonderen Ausführungsform enthält das molekulare Paarungssystem gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nucleinsäure und deren Analoga, insbesondere in Form einer Pentose, vorzugsweise einer Pentopyranose oder Pentofuranose. Im allgemeinen ist die Pentose ausgewählt aus einer Ribose, Arabinose, Lyxose oder Xylose. Besonders bevorzugt ist Pyranosyl-RNA (p-RNA), Nucleinsäure mit einer oder mehreren Aminocyclohexylethansäure(CNA)-Einheiten, peptidische Nucleinsäure (PNA), oder einer Nucleinsäure mit einer oder  
10 mehreren [2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-Nucleobasen. Besonders bevorzugt sind Pyranosyl-Nucleinsäuren (p-NA's) und vor allem p-RNA's.

p-NA's sind im allgemeinen zur natürlichen RNA isomere Strukturtypen, bei denen die Pentose-Einheiten in der Pyranoseform vorliegen und durch Phosphodiestergruppen zwischen den  
15 Positionen C-2' und C-4' repetitiv verknüpft sind. Unter "Nucleobase" werden dabei die kanonischen Nucleobasen A, T, U, C, G, aber auch die Paare Isoguanin/Isocytosin und 2,6-Diaminopurin/Xanthin und im Sinne der vorliegenden Erfindung auch andere Purine und Pyrimidine wie Purin, 2,6-Diaminopurin, 6-Purinthiol, Pyridin, Pyrimidin, Isoguanin, 6-  
20 Thioguanin, Xanthin, Hypoxanthin, Isocytosin, Indol, Tryptamin, N-Phthaloyltryptamin, Coffein, Theobromin, Theophyllin, Benzotriazol oder Acridin, verstanden, und vorzugsweise Ribopyranosyladenosin, Ribopyranosylguanosin, Ribopyranosylthymidin, Ribopyranosylcytosin, Ribopyranosyltryptamin oder Ribopyranosyl-N-phthalotryptamin, Ribopyranosyluracil oder deren [2-Amino-4-(carboxymethyl)-ribopyranosyl]-Derivate.

25 p-NA's, und zwar die von der Ribose abgeleitete p-RNA's, wurden zum erstenmal von Eschenmoser et al. beschrieben (siehe Pitsch, S. et al. Helv. Chim. Acta 1993, 76, 2161; Pitsch, S. et al. Helv. Chim. Acta 1995, 78, 1621; Angew. Chem. 1996, 108, 1619-1623). Sie bilden ausschließlich sogenannte Watson-Crick-gepaarte, d. h. Purin-Pyrimidin- und Purin-  
30 Purin-gepaarte, antiparallele, reversibel „schmelzende“, quasi-lineare und stabile Duplices. Homochirale p-RNA-Stränge entgegengesetzten Chiralitätssinns paaren ebenfalls kontrollierbar und sind in der gebildeten Duplex streng nicht-helical. Diese für den Aufbau supramolekularer Einheiten wertvolle Spezifität hängt mit der relativ geringen Flexibilität des Ribopyranosephosphat-Rückgrats sowie mit der starken Neigung der Basenebene zur Strangachse

und der hieraus folgenden Tendenz zu intercatenarer Basenstapelung im resultierenden Duplex zusammen und läßt sich letztlich auf die Teilnahme eines 2',4'-cis-disubstituierten Ribopyranoserings am Aufbau des Rückgrates zurückführen.

5 Diese wesentlich besseren Paarungseigenschaften machen p-NA's gegenüber DNA und RNA für die Anwendung des Aufbaus supramolekularer Einheiten zu bevorzugten Paarungssystemen. Sie bilden ein zu natürlichen Nucleinsäuren orthogonales Paarungssystem, d. h. sie paaren nicht mit in der natürlich Form vorkommenden DNA's und RNA's, was im besonderen im diagnostischen Bereich vorteilhaft ist.

10 p-NA's eignen sich daher besonders für die Anwendung im Bereich der Nanotechnologie, beispielsweise zur Herstellung neuer Materialien, Diagnostika und Therapeutika sowie mikroelektronischer, photonischer bzw. optoelektronischer Bauteile und für das kontrollierte Zusammenführen molekularer Species zu supramolekularen Einheiten, wie z. B. für den  
15 (kombinatorischen) Aufbau von Proteinasssemblies [siehe z. B. A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. DeGrado, Biomoleküls (Pept. Sci.) 1997, 40, 495-504], da p-NA's, und besonders p-RNA's Paarungssysteme bilden, die stark und thermodynamisch kontrollierbar sind. Eine weitere Anwendung ergibt sich daher gerade im diagnostischen und drug discovery-Bereich durch die Möglichkeit, funktionelle, bevorzugt biologische Einheiten wie Proteine oder  
20 DNA/RNA-Abschnitte, z. B. mit einem p-RNA-Code zu versehen, der nicht mit den natürlichen Nucleinsäuren interferiert (siehe z. B. WO93/20242).

Die Länge der Nucleinsäure und deren Analoga ist gemäß der vorliegenden Erfindung mindestens ca. 4-50, vorzugsweise mindestens ca. 4-25, insbesondere mindestens ca. 4-15, vor allem mindestens ca. 4-10 Nukleotide.

Im allgemeinen ist die Bindungskomponente A an einem Träger immobilisiert.

30 Unter dem Begriff „immobilisiert“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung die Ausbildung einer kovalenten Bindung, quasi-kovalenten Bindung oder supramolekularen Bindung durch Assoziation von zwei oder mehreren molekularen Spezies wie linear konstituierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptoide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nucleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclen, insbesondere Stickstoffheterocyclen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Poly-

saccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile. Funktionelle Teile von Antikörper sind beispielsweise Fv-Fragmente (Skerra & Plückthun (1988) Science 240, 1038), einzelkettige Fv-Fragmente (scFv; Bird et al. (1988), Science 242, 423; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879) oder Fab-Fragmente (Better et al. (1988) Science 240, 1041).

5

Die Trägerung erfolgt somit im allgemeinen kovalent, quasi-kovalent, supramolekular oder physikalisch wie magnetisch (A. R. Shepard et al. (1997) Nucleic Acids Res., 25, 3183-3185, Nr. 15), im elektrischen Feld oder durch einen Molekularsieb. Die Bindungskomponente A wird hierdurch entweder direkt an der Position des Trägers synthetisiert oder an bestimmte  
10 Positionen des Trägers „gelinkt“. Beispiele sind Konjugations- und Trägerverfahren über Perjodatoxidation und reduktiver Aminierung der Schiffbase, N-Hydroxisuccinimidester von vorzugsweise Dicarbonsäurelinker, Ethylendaminphosphoamidatlinker, Mercapto-, Jodacetyl- oder Maleinimido-Verfahren und/oder kovalente oder nicht-kovalente Biotin-Linker-Verfahren.

15

Unter dem Begriff „Träger“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung Material, insbesondere Chipmaterial, das in fester oder auch gelartiger Form vorliegt. Als Trägermaterialien eignen sich beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Mate-  
20 rialien, oder (bio)molekulare Filamente wie Cellulose, Gerüstproteine.

25

Eine besondere Ausführungsform ist daher ein erfindungsgemäßes Erkennungssystem, bei dem die Bindungskomponente A an einen Träger über eine kovalente Bindung, quasi-kovalente Bindung oder supramolekulare Bindung durch Assoziation von zwei oder mehreren  
molekularen Spezien wie linearkonstituierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptoide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nucleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclen, insbesondere Stickstoffheterocyclen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, immobilisiert ist.

30

In einer weiteren Ausführungsform ist die Bindungskomponente A an definierten Stellen des Trägers, insbesondere in Form einer Matrix, immobilisiert, wobei die definierten Stellen des Trägers vorzugsweise adressiert sind.

Gemäß dem bevorzugten Erkennungssystem wird daher ein Molekül in der mobilen (Puffer)-Phase mit der entsprechenden Komplementärsequenz nur an der Position der passenden Adresse einen supramolekularen Komplex spontan ausbilden. Sind an diese mobile Komplementäradresse durch chemische (Konjugate) oder supramolekulare Verbindungsbildung (Komplexe) weitere Einheiten mit besonderen Funktionen wie z.B. der eines Antikörpers gebunden, wird je nach verwendeten Adressenmuster auf demselben Immobilisat-Array ein unterschiedlicher Funktionsarray aufgespannt.

Die großen Vorteile eines solchen modularen Systems sind die identische einmalige Bereitstellung der Trägereinheiten für unterschiedlichste Anwendungen und die *in situ* Erzeugung nicht- haltbarer Bio-Konjugate etwa aus Proteinen, Enzymen oder lebenden Zellen und dem Paarungsrest.

Ein weiterer Vorteil ist die schrittweise Erzeugung von Substratbindungsereignis und dem meßbaren Bindungsereignis an der Trägerposition, d. h. das Substrat kann völlig ungehindert einen ersten Komplex mit der löslichen, adressierten Komponente (Erkennungsspezies B) bilden und anschließend im Raum der Trägerposition paarend an die Bindungskomponente A immobilisieren.

Es ist ferner besonders bevorzugt, wenn die Bindungskomponente A an eine Träger-Elektrode des Trägers immobilisiert ist, da beispielsweise durch eine Signalverstärkung des Impedanzverhaltens von Träger-Elektroden bei Bindungsereignissen ein elektronisch lesbares Signal erzeugt wird. Entsprechende Elektrodenprozesse sind bei R. P. Andres (1996) Science, 272, 1323-1325 und entsprechende Impedanzmessungen sind bei M. Stelzle et al. (1993) J. of Physical Chem., 97, 2974-2981 beschrieben.

Als Erkennungsspezies B ist beispielsweise ein Biomolekül geeignet, welches z. B. ausgewählt ist aus einem Peptid, Peptoid, Protein wie Rezeptor oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors, Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate und deren wirksame Teile, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen, vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide, Peptoide, Saccharide, Nucleinsäuren.

Üblicherweise enthält das Biomolekül eine Binderegion für die Bindungskomponente A, die vorzugsweise eine der oben beschriebenen Nucleinsäuren oder deren Analoga darstellt. Im allgemeinen wird hierbei das Biomolekül an eine ausgewählte Nucleinsäure oder Analogon über einen Linker gebunden. Beispielsweise eignet sich ein Uracil-basierender Linker, bei dem vorzugsweise die 5-Position des Uracils modifiziert wurde, z. B. N-Phthaloylaminoethyluracil, aber auch ein Indol-basierender Linker, vorzugsweise Tryptamin-derivate, wie z. B. N-Phthaloyltryptamin.

- 10 In einer besonderen Ausführungsform enthält die immobilisierte Bindungskomponente A verschiedene Bindestellen für verschiedene Erkennungsspezies B, wodurch verschiedene Erkennungsspezies B an der Bindungskomponente A binden können.

In einer weiteren Ausführungsform ist mindestens eine weitere Erkennungsspezies B an die Bindungskomponente A immobilisiert.

Daher ist ein weiteres erfindungsgemäßes Erkennungssystem dadurch gekennzeichnet, daß es (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens  $2+n$  verschiedenen Bindestellen für mindestens  $2+n$  verschiedene Erkennungsspezies B1, B2 ... Bn und eine weitere von der Erkennungsspezies B1, B2 ... Bn verschiedene Erkennungsspezies B(n+3), die an die immobilisierte Bindungskomponente A immobilisiert ist, und (b) mindestens (n+3) verschiedene Erkennungsspezies B1, B2 ... B(n+3), wobei n eine ganze Zahl von 0-20, vorzugsweise 0-10, insbesondere 0-5, vor allem 0 oder 1 bedeutet.

25 In einer weiteren Ausgestaltung stammt die Erkennungsspezies B1, B2 ... Bn aus einer Substanzbibliothek.

Zur Strukturanalyse eines Komplexes aus einer Substanzbibliothek ist es besonders vorteilhaft, wenn die Struktur der Erkennungsspezies B(n+3) bekannt ist, und/oder die verschiedenen Erkennungsspezies B dasselbe Substrat S erkennen.

30 Unter dem Begriff „Substrat“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung eine nicht-trägergebundene Substanz, die von dem erfindungsgemäßen Erkennungssystem erkannt wer-

den soll. Das Substrat S ist im allgemeinen ausgewählt aus Molekülen, vorzugsweise Arzneistoffe und Pflanzenschutzwirkstoffe, Metaboliten, physiologische Botenstoffe, Derivate von Leitstrukturen. Substanzen, die im menschlichen oder tierischen Körper im Fall von krankhaften Veränderungen produziert oder im erhöhten Maß produziert werden, oder Übergangszustandsanaloge, oder Peptide. Peptoide. Proteine wie Rezeptoren oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors. Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate, oder Monomere wie Heterozyklen, insbesondere Stickstoffheterozyklen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen, vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide. Peptoide. Saccharide, Nucleinsäuren, Ester, Acetale oder Monomere wie Heterocyclen, Lipide, Steroide, oder Angriffsstrukturen von Pharmaka, vorzugsweise Arzneimittelrezeptoren, spannungs-abhängige Ionenkanäle, Transporter, Enzyme oder Biosynthese-Einheiten von Mikroorganismen.

Substanzbibliotheken sind dem Fachmann aus dem Bereich der kombinatorischen Chemie bekannt. Beispiele sind die leicht zugänglichen Peptidbibliotheken, erzeugt durch Permutation der Peptidsequenz. Paaren solche Bibliotheken, entstehen völlig neue Supra-Moleküle bzw. Komplexe. Die beachtliche Anzahl möglicher Komplexe beinhaltet möglicherweise Erkennungsregionen für Substrat-Moleküle, ähnlich dem Epitop eines Antikörpers. Die Ausführungsform läßt dann ein Screening eines solchen stochastischen Bindungsereignisses zu. Ist eine der Konjugatbibliotheken an den Träger gebunden, kann durch die Codonadresse bzw. bei gleichbleibender Adresse durch seine bloße Position direkt seine Identität (z.B. die Peptidsequenz) festgelegt werden. Der Array erzeugt für einen der Paarungsstränge eine sogenannte codierte Bibliothek und vereinfacht die Komplexanalytik der supramolekularen Bibliothek.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt das erfindungsgemäße Erkennungssystem einen Immunoassay dar.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Identifizierung eines Substrates S in einer Probe mit Hilfe des erfindungsgemäßen Erkennungssystems, bei dem

(a) eine Erkennungsspezies B, die das Substrat S erkennt, mit der Probe in Kontakt gebracht wird,

(b) gleichzeitig oder nacheinander mit einer immobilisierten Erkennungsspezies B in Kontakt gebracht wird, und

(c) die Bildung eines Komplexes aus immobilisierter Bindungskomponente A, Erkennungsspezies B und Substrat S nachgewiesen wird.

Insbesondere wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Bildung des Komplexes über physikalische Parameter wie Temperatur, Salze, Lösungsmittel, elektrophoretische Vorgänge gesteuert.

Im allgemeinen wird der sich gebildete Komplex über eine Markierung wie eine radioaktive oder fluoreszierende Markierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung, Spinmarkierung der Erkennungsspezies B nachgewiesen, oder über den Komplex selbst, beispielsweise über Elektrodenprozesse wie über chemische Prozesse, z. B. Redoxprozesse in der Umgebung oder an der Elektrode oder über eine physikalische Meßgröße wie über Impedanzmessung oder Gleichstrommessung.

Besondere Amplifizierungs- oder Vorkonzentrierungsschritte der Substrate werden somit für viele Anwendungen nicht benötigt, was besonders vorteilhaft ist. Die chemische und physikalische Heterogenität der Positionen vor und nach den Paarungsereignissen kann zudem mit dem direktelektronischen Verfahren sehr vorteilhaft durch Parametrisierung bzw. Eichung über die Software eliminiert werden.

Das Problem, daß wichtige Substratmoleküle für solche Anwendungen Moleküle der natürlichen Paarungssysteme DNA und RNA selbst sein können und somit mit der Adressierung in störende Wechselwirkung treten würden, wird dadurch gelöst, daß besonders stabile, selektive und nicht-natürliche Paarungssysteme, wie z. B. p-NA's, verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auch auf ein Verfahren, mit dem Erkennungsspecies, bevorzugt natürliche DNA- oder RNA-Stränge und Proteine, dabei

bevorzugt Antikörper oder funktionelle Teile von Antikörper, durch p-NA-Abschnitte, bevorzugt p-RNA-Abschnitte, eindeutig codiert werden. Diese können dann mit den zugehörigen Codons auf einem festen Träger hybridisiert werden. Damit kann auf einem festen Träger, der in Form eines Arrays mit Codons ausgestattet ist, nur durch Einstellung von Hybridisierungsbedingungen mit immer neuen Kombinationen von Erkennungsspecies an den gewünschten Positionen immer neue, diagnostisch nützliche Arrays aufgebaut werden. Wird dann der Analyt, beispielsweise eine biologische Probe wie Serum o. ä. aufgebracht, dann werden die zu detektierenden Species in einem bestimmten Muster auf dem Array gebunden, welches dann indirekt (z. B. durch Fluoreszenzmarkierung der Erkennungsspecies) oder direkt (z. B. durch Impedanzmessung am Anknüpfungspunkt der Codons) registriert wird. Dann wird die Hybridisierung durch geeignete Bedingung aufgehoben (Temperatur, Salze, Lösungsmittel, elektrophoretische Vorgänge), so daß wieder nur der Träger mit den Codons zurückbleibt. Dieser wird dann erneut mit anderen Erkennungsspecies beladen und wird z. B. für den gleichen Analyten für die Ermittlung eines anderen Musters verwendet. Die immer neue Anordnung von Erkennungsspecies im Array-Format und die Verwendung von p-NA's als Paarungssysteme ist gegenüber anderen Systemen, siehe z. B. WO 96/13522, besonders vorteilhaft.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann in einem weiteren Schritt der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S auch isoliert werden. Hierzu wird z. B. der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S nach Einfrieren des Bindungsgleichgewichts oder kovalentes Cross-Linking von Erkennungsspezies B und Substrat S isoliert.

Das erfindungsgemäße Erkennungssystem eignet sich folglich besonders gut zum Auffinden eines Substrates S, zur Diagnose, zur Herstellung eines Katalysators und/oder zur Herstellung eines elektronischen Bauteils, insbesondere zum Auffinden, zur Optimierung und/oder zur Herstellung eines Arzneiwirkstoffes oder Pflanzenschutzwirkstoffes.

Je nach den synthetisierten Adressen können somit für unterschiedliche Fragestellungen bzw. diagnostische Probleme schnell Kits zusammengestellt werden, die auf dem existierenden Codon-Array *in situ* das Testsystem durch Paarung bildet. Bevorzugt werden Biomoleküle, z. B. ganz allgemein Zell- oder Virus-Bestandteile, ganz besonders monoklonale Antikörper oder deren funktionelle Teile.



Die folgenden Figuren sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

## BESCHREIBUNG DER FIGUREN

- 5 Fig. 1 zeigt schematisch das allgemeine Prinzip einer Erkennungsspezies, die *in situ* um ein zu erkennendes Substrat erzeugt wird. Die Komplexierungseinheit (Peptid) kann durch eine Trägermatrix bekannt sein. Hierbei bildet sich eine thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert konstituierte Bindungstasche als Komplex mit dem Substrat. Die zu allen B-Einheiten komplementäre Paarungseinheit A ist am Träger fixiert  
10 (immobilisiert).
- Fig. 2 zeigt schematisch eine Anordnung von immobilisierten Erkennungsstrukturen (Arrays) auf einem festen Träger.
- 15 Fig. 3 zeigt schematisch die modulare Erzeugung eines supramolekularen Arrays. Auf dem gleichen Anticodon-Träger werden durch Adressierung mit den selektiven Paarungsregionen unterschiedliche Immunoarrays aufgebaut.
- Fig. 4 zeigt schematisch den Aufbau eines Arrays mit 4 Trägerpositionen (Elektroden) und  
20 das Meßprinzip.
- Fig. 5 zeigt schematisch UV-spektroskopisch und Impedanz-spektroskopisch den Nachweis der Paarung der Anticodon-Codon-Moleküle. Durch Temperaturniedrigung paaren die Stränge, der Pufferüberstand verarmt, die UV-Extinktion des Überstandes nimmt  
25 ab bzw. die Veränderung der Elektrodendoppelschicht wirkt auf die Impedanzmessung.
- Fig. 6 zeigt schematisch die Funktionsweise eines adressierten Immunoarrays. Lediglich Elektrode 3 trägt die passende Adresse zu einem Antikörper-Paarungsstrang-Konjugat. Wird das passende Antigen zugegeben, verändert sich die Impedanz an der  
30 Elektrode 1 anders als durch bloße Pufferveränderung an den anderen Elektroden.
- Fig. 7 zeigt die Abkühlkurven eines temperaturinduzierten UV-Paarungsexperiments mit zwei komplementären p-RNA-Adressen, an die jeweils ein Histidin-Peptid konju-

giert ist. Die Paarung erzeugt eine Erkennungsregion für Nickelionen als Substrat. Das Substrat führt zu einer deutlichen Erhöhung der Umwandlungstemperatur  $T_m$ , die ohne die Histidinreste nicht beobachtet wird.

Fig. 8 zeigt schematisch eine einfache Matrix aus zwei aufgedampften Goldelektroden.

Fig. 9 zeigt den direktelektronischen Nachweis eines Antigen-Antikörperkomplexes auf einer Elektrodenposition des Arrays durch Impedanzspektroskopie.

Fig. 10 zeigt einen zusätzlichen Nachweis des Antigen-Antikörperkomplexes auf der adsorbierten Elektrode mittels Fluoreszenz.

## Beispiele

### Beispiel 1

Synthese eines einen Linker enthaltenden p-RNA-Oligonucleotids mit Linker der Formel 4' AGGCAIndT 2':

#### 1.1 Festphasensynthese des Oligonucleotids

A, G, C, T steht für die Nucleobasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin und Ind bedeutet Aminoethylindol (Indol  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ) als Linker in Form einer Nucleobase.

Die vollautomatische Festphasensynthese wurde mit jeweils 15  $\mu\text{mol}$  durchgeführt. Ein Synthesesyklus besteht aus den folgenden Schritten:

(a) Detritylierung: 5 Minuten mit 6% DCA (Dichloressigsäure) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (79 ml).

(b) Waschen mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml), Acetonitril (20 ml) und danach Spülen mit Argon;

(c) Kupplung: Waschen des Harzes mit dem Aktivator (0,5 M Pyridin.HCl in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0,2 ml) und anschließend 30minütiges Behandeln mit Aktivator (0,76 ml) und Phosphoramidit der entsprechenden Nucleobase (0,76 ml : 8 eq; 0,1 M in Acetonitril) im Verhältnis 1/1;

- (d) Capping: 2-minütiges Behandeln mit 50% Cap A (10,5 ml) und 50% Cap B (10,5 ml) von PerSeptive Biosystems, Inc., Texas, USA (Cap A: THF, Lutidine, Acetanhydrid; Cap B: 1-Methylimidazol, THF, Pyridin);
- (e) Oxidation: 1-minütiges Behandeln mit 120 ml Iodlösung (400 mg Jod in 100 ml Acetonitril, 46 ml H<sub>2</sub>O und 9,2 ml sym-Collidine); und
- (f) Waschen mit Acetonitril (22 ml).

Zur Erleichterung der nachfolgenden HPLC Reinigung der Oligonucleotide wurde die letzte DMT(Dimethoxytrityl)-Gruppe nicht abgespalten. Zum Nachweis der letzten Kupplung mit den modifizierten Phosphoramiditen wurde nach der Synthese mit 1% des Harzes eine Tritylkationabsorption in UV (503 nm) durchgeführt.

#### 1.2 Aufarbeitung des Oligonucleotids:

- Die Abspaltung der Allyletherschutzgruppen erfolgte mit einer Lösung von Tetraakis(triphenylphosphin)palladium (272mg), Triphenylphosphin (272 mg) und Diethylammoniumhydrogencarbonat in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15ml) nach 5 Stunden bei RT. Die Glaträger wurden danach mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30ml), Aceton (30ml) und Wasser (30ml) gewaschen. Um Palladiumkomplexreste zu entfernen, wurde das Harz mit einer wäßrigen 0,1 M Natriumdiethyldithiocarbamathydratlösung gespült. Die obenerwähnte Waschoption wurde in einer umgekehrten Reihe noch einmal durchgeführt. Anschließend wurde das Harz am Hochvakuum 10 Minuten getrocknet. Der Abspaltungsschritt vom Glaträger bei gleichzeitiger Debenzoylierung wurde in 24% Hydrazinhydratlösung (6ml) bei 4°C durchgeführt. Nach HPLC-Kontrolle an RP 18 (18-25 Stunden) wurde das Oligonucleotid „Trityl ON“ mittels einer aktivierten (Acetonitril, 20 ml) Waters Sep-Pak Cartridge vom Hydrazin befreit. Das Hydrazin wurde mit TEAB, 0,1M (30ml) gewaschen. Das Oligonucleotid wurde dann mit Acetonitril/TEAB, 0,1M (10ml) eluiert. Anschließend wurde mittels HPLC zur Abtrennung von Abbruchsequenzen gereinigt und die DMT-Entschützung (30 ml 80%ig wäßrige Ameisensäure) durchgeführt. Abschließende Entsalzung (über Sep-Pak Kartouche, mit TEAB Puffer 0,1M/Acetonitril: 1/1) lieferte das reine Oligonucleotid.

#### Beispiel 2

Jodacetylierung von *p*-RNA mit N-(Jodacetyloxy)-succinimid

*p*-RNA-Sequenz : 4' AGGCAIndT 2'  $M_w = 2266.56$  g/mol. hergestellt gemäß Beispiel 1.

5 1 eq. der *p*-RNA wurde in einer 0.1 molaren Natriumhydrogencarbonatlösung (pH 8,4) gelöst (1 ml pro 350 nmol) und mit einer Lösung von N-(Jodacetyloxy)-succinimid in DMSO versetzt (40  $\mu$ l pro mg). Man dunkelt den Ansatz mit Aluminiumfolie ab und ließ ihn bei Raumtemperatur für 30-90 Minuten stehen.

10 Der Fortgang der Reaktion wurde mittels analytischer HPLC verfolgt. Die Standardbedingungen waren:

Puffer A : 0.1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser

Puffer B : 0.1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser:Acetonitril 1:4

Gradient : von 10% B startend auf 50% B in 40 Minuten

15 Säulenmaterial : 10  $\mu$ M LiChrosphere<sup>®</sup> 100 RP-18 von Merck Darmstadt GmbH; 250 x 4 mm

Retentionszeit der Edukte: 18,4 Minuten

Retentionszeit der Produkte in diesem Falle : 23.1 Minuten

20 Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz mit Wasser auf das vierfache Volumen verdünnt. Man aktivierte eine Waters Sep-Pak-Kartusche RP-18 (ab 15 oD 2 g Füllung) mit 2 x 10 ml Acetonitril und 2 x 10 ml Wasser, trug das Oligonucleotid auf, ließ einsinken, wusch das Reaktionsgefäß mit 2 x 10 ml Wasser, wusch mit 3 x 10 ml Wasser nach, um Salz und Reagenz zu entfernen, und eluierte zuerst mit 5 x 1 ml 50:1 Wasser : Acetonitril und anschließend mit  
25 1:1. Das Produkt eluierte in den 1:1-Fractionen in sehr guter Reinheit. Die Fractionen wurden in der Kälte und im Dunkeln eingengt, vereinigt, und wieder eingengt.

Die Ausbeuten wurden mittels UV-Absorptionspektrometrie bei 260 nm bestimmt.

Massenspektrometrie :

30 Sequenz : 4' AGGCAInd(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>-I)T 2'

berechnete Masse : 2434.50 g/mol

gefundene Masse  $MH_2^{2+}$  : 1217.9 g/mol = 2433

### Beispiel 3

Konjugation von *p*-RNA an ein Peptid der Sequenz (His)<sub>6</sub>:

Die jodacetylierte *p*-RNA ( $M_w = 2434.50$  g/mol) wurde in einem Puffersystem gelöst (1000 µl pro 114 nmol) und dann mit einer Lösung des Peptides in Puffer versetzt (2 moleq. (His)<sub>6</sub>-Peptid).

Puffersystem : Borax/HCl-Puffer der Firma Riedel-de Haën, pH 8,0, wurde im Verhältnis 1:1 mit einer 10 millimolaren Lösung von EDTA-Dinatriumsalz in Wasser gemischt und auf pH 6,3 mit HCl eingestellt. Man erhielt dadurch eine Lösung, die 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA enthält.

Man beließ den Ansatz bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Reaktion wurde mittels HPLC-Analytik verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz direkt mittels RP-HPLC gereinigt. Die Fraktionen wurden in der Kälte und im Dunkeln eingengt, vereinigt, und wieder eingengt. Man nahm in Wasser auf und entsalzte. Man aktivierte eine Waters Sep-Pak-Kartusche RP-18 (ab 15 oD 2 g Füllung) mit 2 x 10 ml Acetonitril und 2 x 10 ml Wasser, trug das Oligonucleotid auf, ließ einsinken, wusch das Reaktionsgefäß mit 2 x 10 ml Wasser, wusch mit 3 x 10 ml Wasser nach, um das Salz zu entfernen, und eluierte mit Wasser : Acetonitril 1:1. Die Produkt-Fractionen wurden eingengt, vereinigt, und wieder eingengt.

Die Ausbeuten wurden mittels UV-Absorptionspektrometrie bei 260 nm bestimmt. Sie erreichten 70-95% der Theorie.

HPLC-Analytik:

Puffer A : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser

Puffer B : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser:Acetonitril 1:4

Gradient : von 10% B startend auf 50% B in 40 Minuten

Säulenmaterial : 10 µM LiChrosphere<sup>®</sup> 100 RP-18 von Merck Darmstadt GmbH; 250 x 4

Retentionszeit des Produktes : 16.9 Minuten

Massenspektrometrie :

Sequenz : 4' AGGCAInd(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>-(His)<sub>6</sub>T 2'

berechnete Masse : MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> : 1626,9 g/mol

gefundene Masse MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> : 1626,0 g/mol

Analog wurde die komplementäre Sequenz 4' Ind(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>-(His)<sub>6</sub>TGCCT 2' hergestellt:

berechnete Masse MH<sub>2</sub><sup>2+</sup>: 1436,2 g/mol

5                    gefundene Masse MH<sub>2</sub><sup>2+</sup>: 1436,4 g/mol

Analog wurden auch Peptidbibliotheken zur Bildung von Erkennungsregionen an die p-RNA konjugiert.

10    Im UV-Lösungsexperiment konnte nachgewiesen werden, daß die Wechselwirkung der Histidinuntereinheiten mit einem Substrat (Nickel-Ionen), die Paarungseigenschaften selbst beeinflussen. Eine je 5µM p-RNA-Konjugatlösung in 10mM Tris HCl 150mM ultrarein NaCl zeigte im UV-Paarungsexperiment ein T<sub>m</sub> von 32°C, der sich nach Zugabe von 10 Äquivalenten Nickel-Ionen pro Strang um 10° C auf 42° erhöhte. Somit geht der Nachweis, d. h. die  
15    Erkennung eines Substrates hier sehr vorteilhaft mit der Adressierung selbst einher; das entspricht auf der Trägermatrix dem Immobilisierungsvorgang.

20

#### Beispiel 4

Direktelektronische Detektion einer Antikörper/Antigen-Erkennung auf dem adressierbaren Erkennungssystem

25

Eine einfache Matrix aus zwei aufgedampften Goldelektroden wurde als Beispiel eines adressierbaren Erkennungssystems verwendet (siehe Fig. 8).

30

An eine jodacetylierte p-RNA Sequenz wurde eine im Handel erhältliche Thiol-reduzierte Antikörpereinheit (Rockland Immunochemicals, Pennsylvania, USA) wie oben beschrieben ankonjugiert.

Die komplementäre p-RNA-Einheit 4'Ind--TAGGCAAT 2' wurde mittels 100 äquivalenten Traut's Reagenz in 1mM wässriger EDTA und Borax Puffer pH 9.5 am Aminolinker Thiol-

aktiviert. nach 6 Stunden reversed-phase-HPL-chomatographisch gereinigt, und über Nacht an einer der beiden frisch mittels UV-licht gereinigten Gold-Elektroden gebunden. Nur diese Elektrode bindet das Antikörper-p-RNA-Konjugat durch Paarung (siehe Fig. 9).

- 5 Die Figur zeigt das Impedanz-Signal (ohne weitere Beschaltung; Spektrometer Solarton Instruments 1260 interface; Solarton Instruments SI 1287) des thio-reduzierten Antikörpers, der direkt über Nacht auf eine frisch gereinigte Elektrode der beschriebenen Art gebunden wurde vor und nach einer Antikörper-Antigen-Komplexierung des immobilisierten Antikörpers unter den Pufferbedingungen 1/15 mol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4 und Raumtemperatur.

10

Das Erkennungs-Ergebnis konnte im gewählten Fall mittels Fluoreszenzmarker geprüft werden, da das im Handel erhältliche Antigen (eine Human-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Fraktion Rockland Immunochemicals) Fluorescein-markiert ist (siehe Fig. 10).

15

5    Patentansprüche

1.    Erkennungssystem enthaltend
  - (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bin-  
destelle für die Erkennungsspezies B und
  - (b) mindestens eine Erkennungsspezies B, die an die Bindungskomponente A binden  
kann und mindestens eine Bindestelle für ein Substrat S enthält, dadurch gekennzeich-  
net, daß die Bindung der Bindungskomponente A an die Erkennungsspezies B in Form  
eines molekularen Paarungssystems erfolgt.
2.    Erkennungssystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Paarungssystem  
einen Komplex darstellt, der durch Assoziation der Bindungskomponente A mit der Er-  
kennungsspezies B über nicht-kovalente Wechselwirkungen gebildet wird.
3.    Erkennungssystem nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht-kovalenten  
Wechselwirkungen ausgewählt sind aus Wasserstoffbrücken. Salzbrücken. Stapelung  
(„Stacking“), Metalligandierungen. Charge-Transfer-Komplexe und hydrophobe Wech-  
selwirkungen.
4.    Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß das  
molekulare Paarungssystem eine Nucleinsäure und deren Analoga enthält.
5.    Erkennungssystem nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäuren  
und deren Analoga eine Pentose, vorzugsweise eine Pentopyranose oder Pentofuranose  
ist.
6.    Erkennungssystem nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Pentose ausge-  
wählt ist aus einer Ribose. Arabinose, Lyxose oder Xylose.



7. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 4-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäure und deren Analoga ausgewählt ist aus Pyranosyl-RNA (p-RNA), Nucleinsäure mit einer oder mehreren Aminocyclohexylethansäure(CNA)-Einheiten, peptidische Nucleinsäure (PNA), oder einer Nucleinsäure mit einer oder mehreren [2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-Nucleobasen.  
5
8. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 4-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleobase der Nucleinsäure oder deren Analoga ausgewählt ist aus Purin, 2,6-Diaminopurin, 6-Purinthiol, Pyridin, Pyrimidin, Adenin, Guanin, Isoguanin, 6-Thioguanin, Xanthin, Hypoxanthin, Thymidin, Cytosin, Isocytosin, Indol, Tryptamin, N-Phthaloyltryptamin, Uracil, Coffein, Theobromin, Theophyllin, Benzotriazol oder Acridin.  
10
9. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 4-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäureanaloga ausgewählt sind aus Ribopyranosyladenosin, Ribopyranosylguan-  
15 nosin, Ribopyranosylthymidin, Ribopyranosylcytosin, Ribopyranosyltryptamin oder Ribopyranosyl-N-phthalotryptamin, Ribopyranosyl-uracil oder deren [2-Amino-4-(carboxymethyl)ribopyranosyl]-Derivate.
- 20 10. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 4-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Länge der Nucleinsäure und deren Analoga mindestens ca. 4-50, vorzugsweise mindestens ca. 4-25, insbesondere mindestens ca. 4-15, vor allem mindestens ca. 4-10 Nukleotide ist.
- 25 11. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an einem Träger immobilisiert ist.
12. Erkennungssystem nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ausgewählt ist aus Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline  
30 Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente, wie Cellulose, Gerüstproteine.
13. Erkennungssystem nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an einen Träger über eine kovalente Bindung, quasi-kovalente

Bindung oder supramolekulare Bindung durch Assoziation von zwei oder mehreren molekularen Spezies wie linearkonstituierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptoide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nucleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclen, insbesondere Stickstoffheterocyclen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, immobilisiert ist.

14. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an definierten Stellen des Trägers, vorzugsweise in Form einer Matrix, immobilisiert ist.
15. Erkennungssystem nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die definierten Stellen des Trägers adressiert sind.
16. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 11-15, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an eine Träger-Elektrode des Trägers immobilisiert ist.
17. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-16 dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennungsspezies B ein Biomolekül ist.
18. Erkennungssystem nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Biomolekül ausgewählt ist aus Peptid, Peptoid, Protein wie Rezeptor oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors, Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate und deren wirksame Teile, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen, vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide, Peptoide, Saccharide, Nucleinsäuren.
19. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß die immobilisierte Bindungskomponente A verschiedene Bindestellen für verschiedene Er-

kennungsspezies B enthält, wodurch verschiedene Erkennungsspezies B an der Bindungskomponente A binden können.

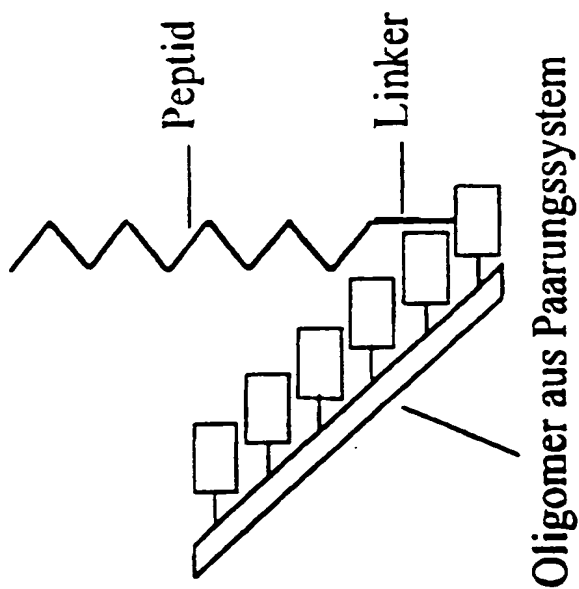
20. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine weitere Erkennungsspezies B an die Bindungskomponente A immobilisiert ist.
21. Erkennungssystem nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß es
- (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens  $2+n$  verschiedenen Bindestellen für mindestens  $2+n$  verschiedene Erkennungsspezies B1, B2 ... Bn und eine weitere von der Erkennungsspezies B1, B2 ... Bn verschiedene Erkennungsspezies B(n+3), die an die immobilisierte Bindungskomponente A immobilisiert ist, und
- (b) mindestens (n+3) verschiedene Erkennungsspezies B1, B2 ... B(n+3),
- wobei n eine ganze Zahl von 0-20, vorzugsweise 0-10, insbesondere 0-5, vor allem 0 oder 1 bedeutet.
22. Erkennungssystem nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennungsspezies B1, B2 ... Bn aus einer Substanzbibliothek stammt.
23. Erkennungssystem nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktur der Erkennungsspezies B(n+3) bekannt ist.
24. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 19-23, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen Erkennungsspezies B dasselbe Substrat S erkennen.
25. Erkennungssystem nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat S ausgewählt ist aus Moleküle, vorzugsweise Arzneistoffe und Pflanzenschutzwirkstoffe, Metaboliten, physiologische Botenstoffe, Derivate von Leitstrukturen, Substanzen, die im menschlichen oder tierischen Körper im Fall von krankhaften Veränderungen produziert oder im erhöhten Maß produziert werden, oder Übergangszustandanaloge, oder Peptide, Peptoide, Proteine wie Rezeptoren oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors, Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-

Fragmente, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate, oder Monomere wie Heterozyklen, insbesondere Stickstoffheterozyklen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen, vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide, Peptoide, Saccharide, Nucleinsäuren, Ester, Acetale oder Monomere wie Heterocyclen, Lipide, Steroide, oder Angriffsstrukturen von Pharmaka, vorzugsweise Arzneimittelrezeptoren, spannungs-abhängige Ionenkanäle, Transporter, Enzyme oder Biosynthese-Einheiten von Mikroorganismen.

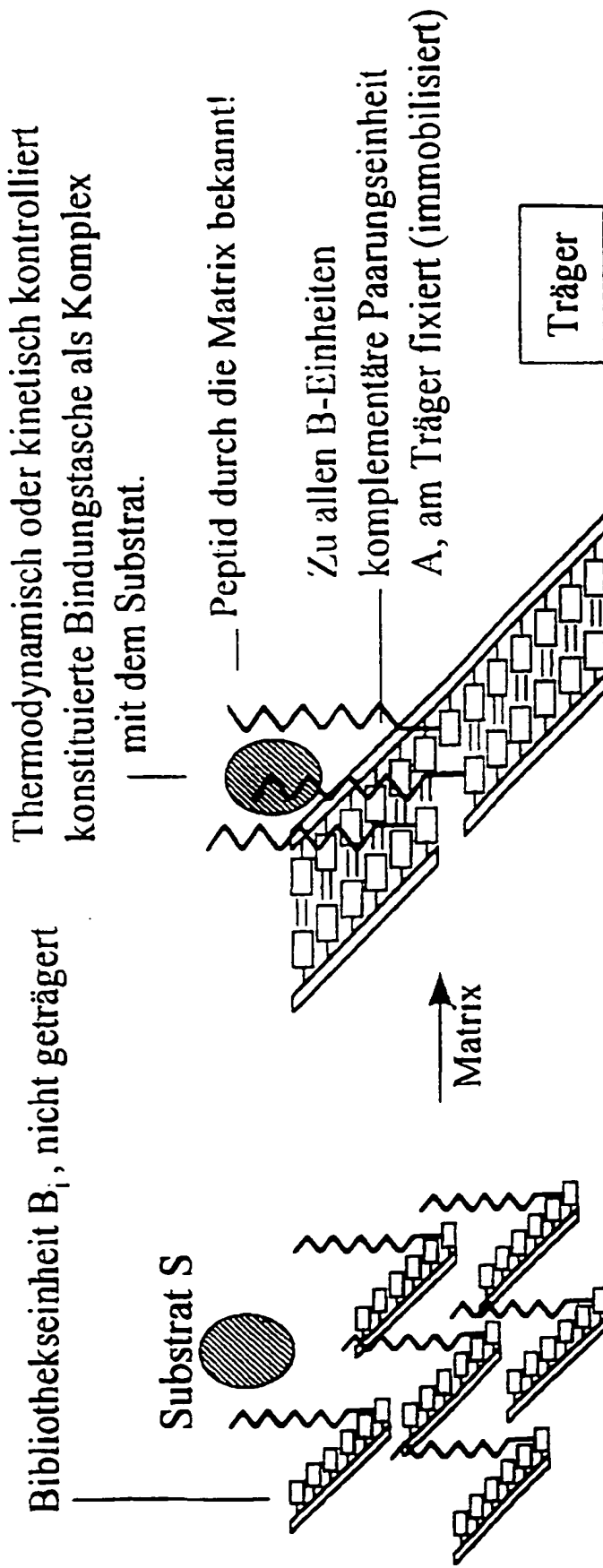
26. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-25, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Immunoassay darstellt.
27. Verfahren zur Identifizierung eines Substrates S in einer Probe mit Hilfe des Erkennungssystems gemäß einem der Ansprüche 1-26, dadurch gekennzeichnet, daß
  - (a) eine Erkennungsspezies B, die das Substrat S erkennt, mit der Probe in Kontakt gebracht wird,
  - (b) gleichzeitig oder nacheinander mit einer immobilisierten Erkennungsspezies B in Kontakt gebracht wird, und
  - (c) die Bildung eines Komplexes aus immobilisierter Bindungskomponente A, Erkennungsspezies B und Substrat S nachgewiesen wird.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Bildung des Komplexes über physikalische Parameter wie Temperatur, Salze, Lösungsmittel, elektrophoretische Vorgänge gesteuert wird.
29. Verfahren nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex über eine Markierung wie eine radioaktive oder fluoreszierende Markierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung, Spinnmarkierung der Erkennungsspezies B nachgewiesen wird, oder über den Komplex selbst, beispielsweise über Elektrodenprozesse wie über chemische Prozesse, z. B. Redoxprozesse in der Umgebung oder an der Elektrode oder über eine physikalische Meßgröße wie über Impedanzmessung oder Gleichstrommessung.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 27-29, dadurch gekennzeichnet, daß in einem weiteren Schritt der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S isoliert wird.
31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S nach Einfrieren des Bindungsgleichgewichts oder kovalentes Cross-Linking von Erkennungsspezies B und Substrat S isoliert wird.
32. Verwendung des Erkennungssystems gemäß einem der Ansprüche 1-26 zum Auffinden eines Substrates S, zur Diagnose, zur Herstellung eines Katalysators und/oder zur Herstellung eines elektronischen Bauteils, insbesondere zum Auffinden, zur Optimierung und/oder zur Herstellung eines Arzneiwirkstoffes oder Pflanzenschutzwirkstoffes.

Fig. 1



Oligomer aus Paarungssystem



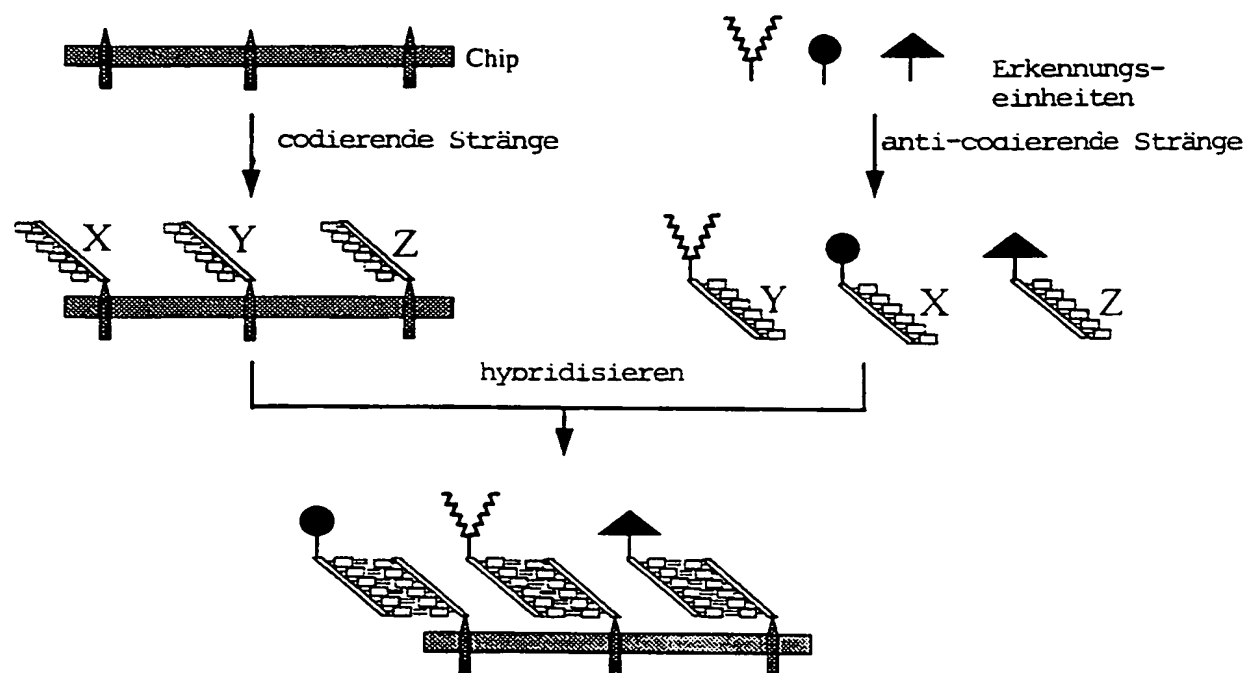


Fig. 2

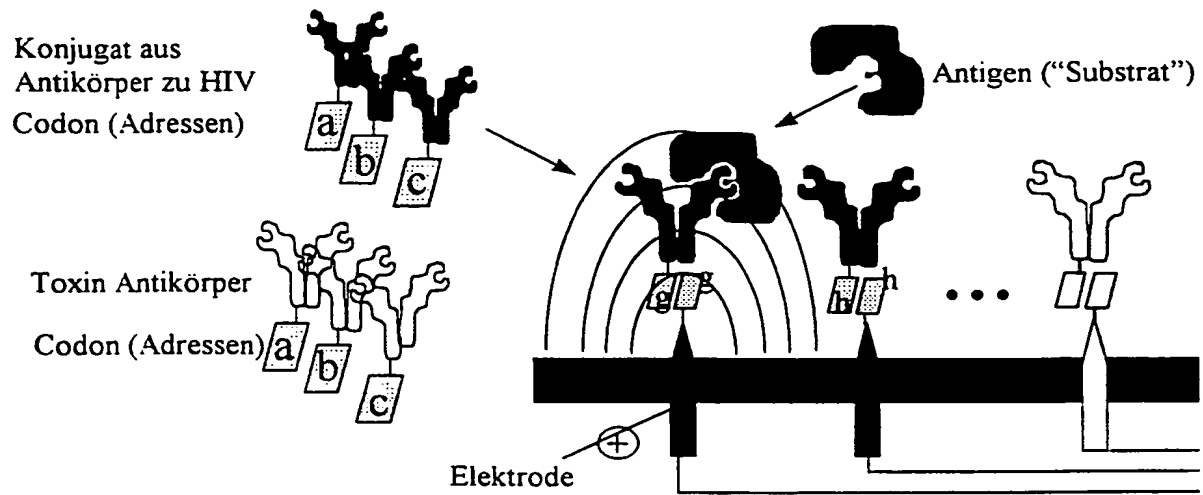
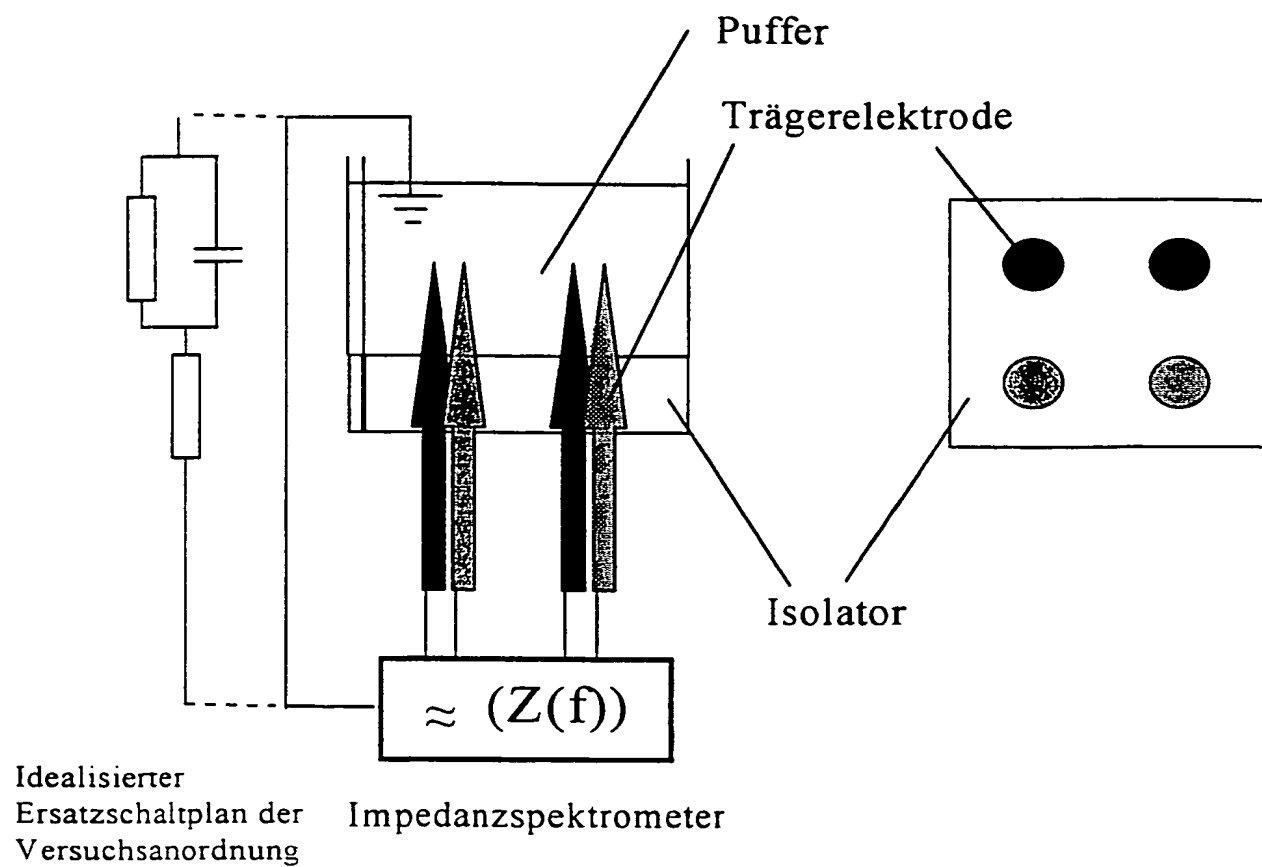


Fig. 3



**Fig. 4**

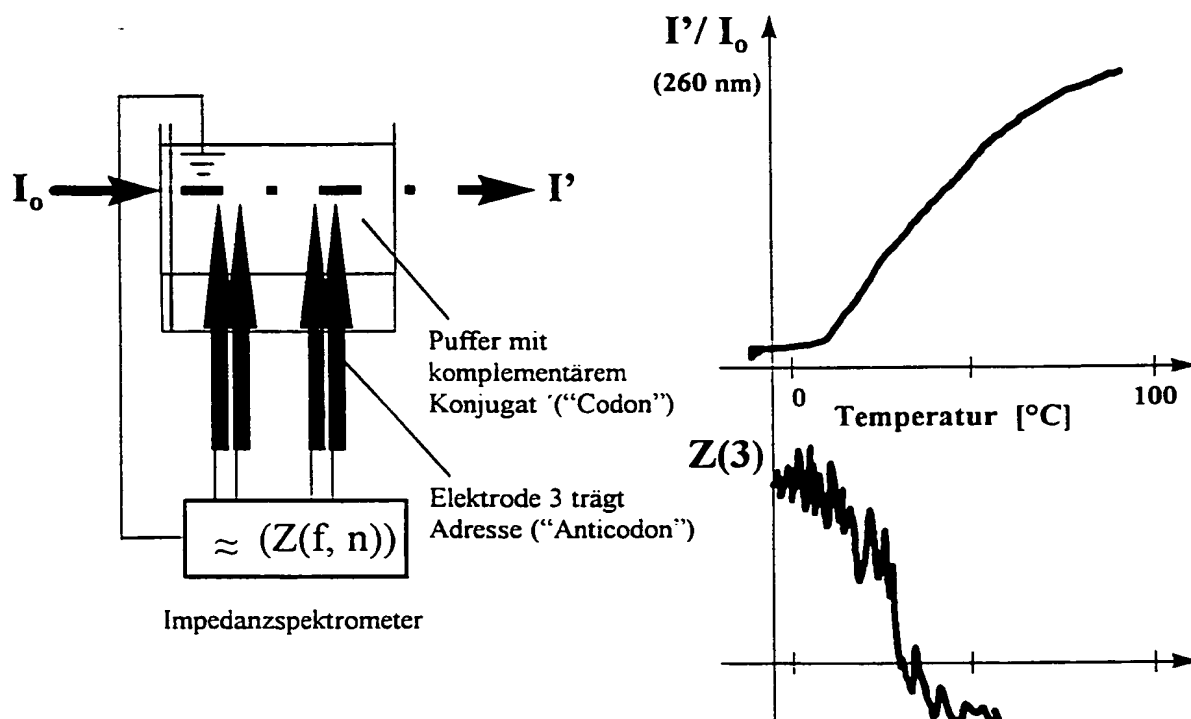


Fig. 5

5

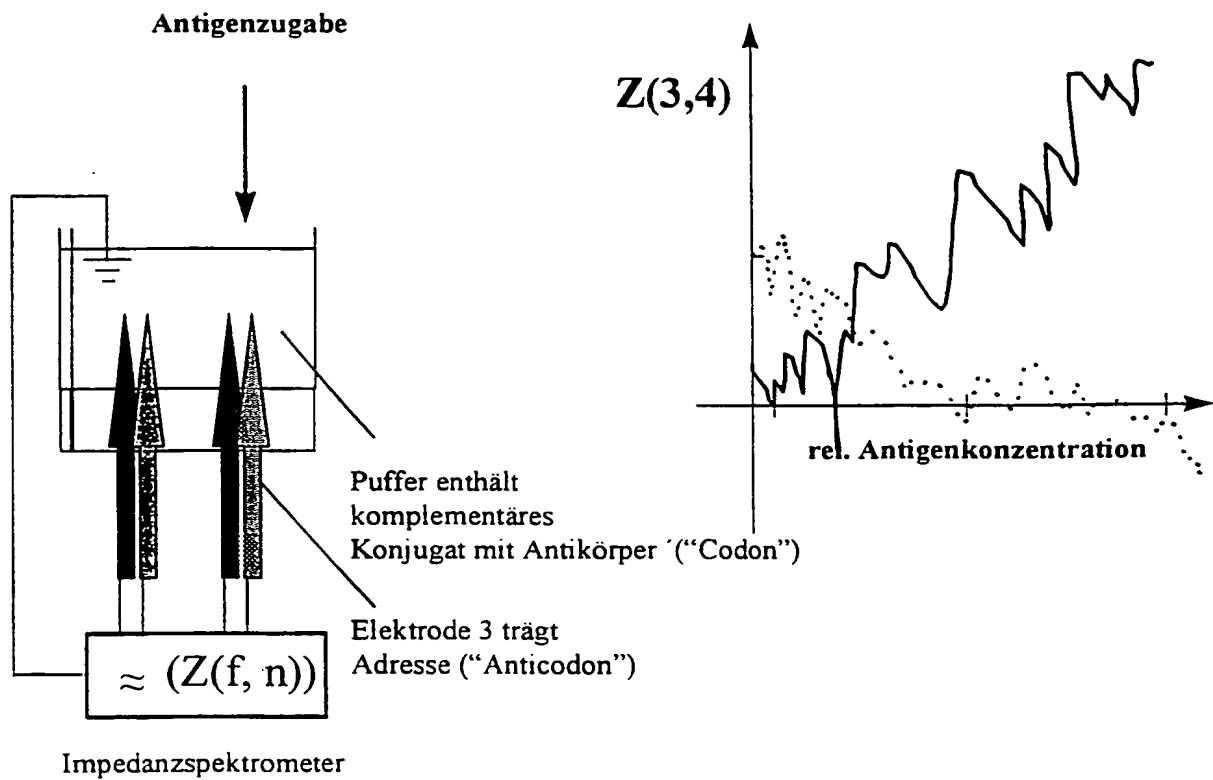
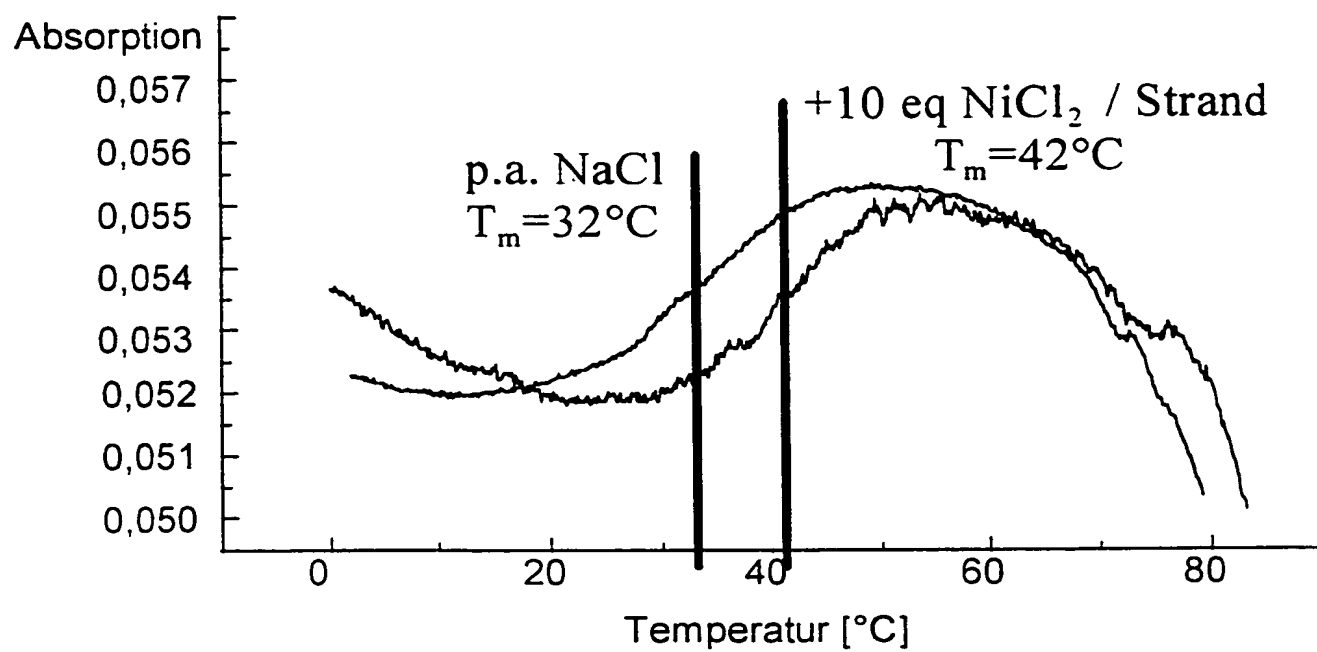
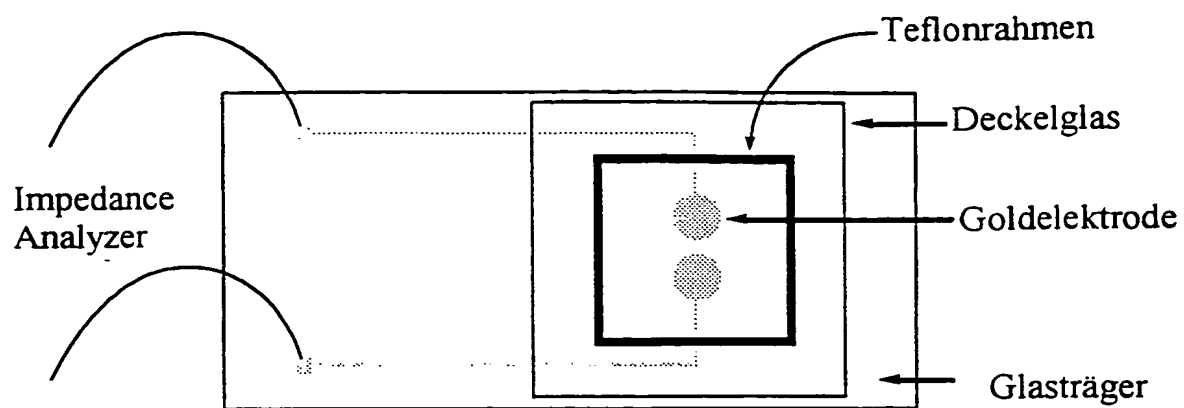


Fig. 6

**Fig. 7**



5

Fig. 8

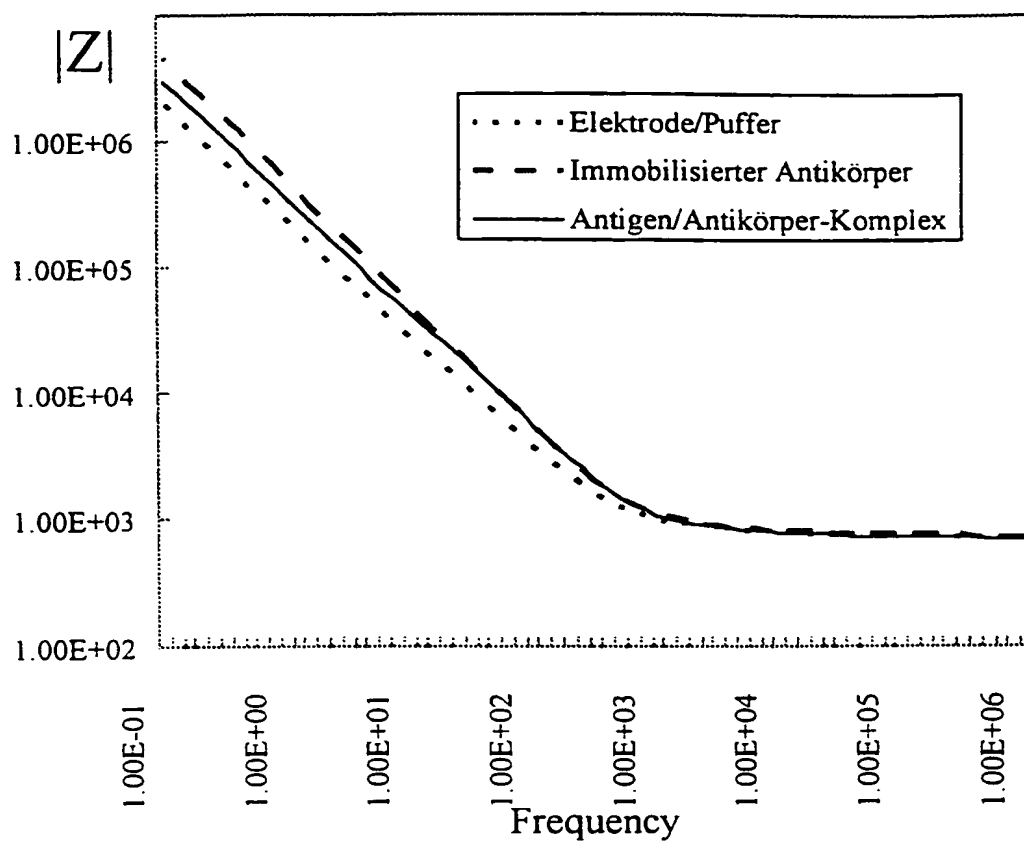
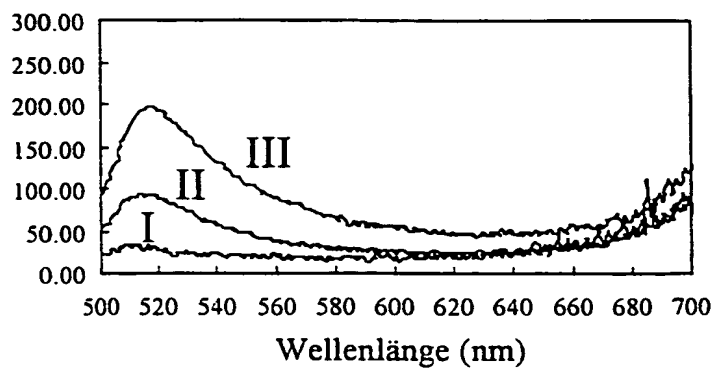


Fig. 9

Fluoreszenz (%)

III adressierte Elektrode nach  
Antigenerkennung

II Antigen-Lösung

I Elektrodenoberfläche ohn  
Antigen

Fig. 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/06001

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/50 G01N33/53 C12Q1/68 C07K1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 97 43232 A (ESCHENMOSER ALBERT ;MICULKA CHRISTIAN (DE); HOECHST AG (DE); WINDH) 20 November 1997 see the whole document ---	1-32
T	WO 98 25943 A (ESCHENMOSER ALBERT ;HOPPE HANS ULRICH (DE); MICULKA CHRISTIAN (DE)) 18 June 1998 see the whole document ---	1
P,X	WO 97 40385 A (SEUL MICHAEL) 30 October 1997 see figure 10 ---	1-3
Y	WO 96 13522 A (BURSTEIN LAB INC) 9 May 1996 cited in the application see page 8, line 15 - page 16 ---	1-32
-/--		



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 1999

Date of mailing of the international search report

01/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/06001

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 93 20242 A (SCRIPPS RESEARCH INST ;LERNER RICHARD (US); JANDA KIM (US); BRENNE) 14 October 1993 see claims 19-22 ----	1-32
X	WO 95 07289 A (AMOCO CORP) 16 March 1995  see figure 1 ----	1-14, 17-29
X	WO 96 40991 A (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC) 19 December 1996 see claim 1 ----	1-3
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ;LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31 July 1997 see figure 13B ----	1-3
X	US 5 188 937 A (SCHULTE THOMAS H ET AL) 23 February 1993 see the whole document ----	1-3
X	WO 95 04136 A (COR THERAPEUTICS INC ;GIESE NEILL A (US)) 9 February 1995 see the whole document ----	1-3
A	EP 0 543 550 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ;HOUSTON ADVANCED RES CENTER (US); MASSACH) 26 May 1993 see page 9, line 9 - line 51; figures 4-7 -----	1-4, 14-17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06001

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9743232 A	20-11-1997	DE 19619373 A AU 2895397 A	20-11-1997 05-12-1997
WO 9825943 A	18-06-1998	DE 19651560 A AU 5661298 A	18-06-1998 03-07-1998
WO 9740385 A	30-10-1997	NONE	
WO 9613522 A	09-05-1996	AU 4197396 A EP 0789715 A JP 10508304 T US 5718915 A	23-05-1996 20-08-1997 18-08-1998 17-02-1998
WO 9320242 A	14-10-1993	US 5573905 A AU 685050 B AU 3944993 A CA 2132103 A EP 0643778 A JP 7505530 T US 5723598 A	12-11-1996 15-01-1998 08-11-1993 14-10-1993 22-03-1995 22-06-1995 03-03-1998
WO 9507289 A	16-03-1995	US 5484909 A EP 0674650 A JP 8503620 T US 5705339 A	16-01-1996 04-10-1995 23-04-1996 06-01-1998
WO 9640991 A	19-12-1996	US 5789163 A AU 5871396 A EP 0832291 A	04-08-1998 30-12-1996 01-04-1998
WO 9727317 A	31-07-1997	AU 2253397 A EP 0880598 A	20-08-1997 02-12-1998
US 5188937 A	23-02-1993	NONE	
WO 9504136 A	09-02-1995	AU 7408094 A CA 2166871 A EP 0711341 A JP 9501767 T	28-02-1995 09-02-1995 15-05-1996 18-02-1997
EP 0543550 A	26-05-1993	JP 5322817 A US 5532128 A US 5670322 A US 5653939 A US 5846708 A	07-12-1993 02-07-1996 23-09-1997 05-08-1997 08-12-1998

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N33/50 G01N33/53 C12Q1/68 C07K1/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 97 43232 A (ESCHENMOSER ALBERT ;MICULKA CHRISTIAN (DE); HOECHST AG (DE); WINDH) 20. November 1997 siehe das ganze Dokument ---	1-32
T	WO 98 25943 A (ESCHENMOSER ALBERT ;HOPPE HANS ULRICH (DE); MICULKA CHRISTIAN (DE)) 18. Juni 1998 siehe das ganze Dokument ---	1
P,X	WO 97 40385 A (SEUL MICHAEL) 30. Oktober 1997 siehe Abbildung 10 ---	1-3
Y	WO 96 13522 A (BURSTEIN LAB INC) 9. Mai 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 8, Zeile 15 - Seite 16 ---	1-32
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*A\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/03/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Osborne, H

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 93 20242 A (SCRIPPS RESEARCH INST ;LERNER RICHARD (US); JANDA KIM (US); BRENNE) 14. Oktober 1993 siehe Ansprüche 19-22 ----	1-32
X	WO 95 07289 A (AMOCO CORP) 16. März 1995  siehe Abbildung 1 ----	1-14, 17-29
X	WO 96 40991 A (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC) 19. Dezember 1996 siehe Anspruch 1 ----	1-3
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ;LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31. Juli 1997 siehe Abbildung 13B ----	1-3
X	US 5 188 937 A (SCHULTE THOMAS H ET AL) 23. Februar 1993 siehe das ganze Dokument ----	1-3
X	WO 95 04136 A (COR THERAPEUTICS INC ;GIESE NEILL A (US)) 9. Februar 1995 siehe das ganze Dokument ----	1-3
A	EP 0 543 550 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ;HOUSTON ADVANCED RES CENTER (US); MASSACH) 26. Mai 1993 siehe Seite 9, Zeile 9 - Zeile 51; Abbildungen 4-7 -----	1-4, 14-17

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9743232 A	20-11-1997	DE 19619373 A	20-11-1997
		AU 2895397 A	05-12-1997
WO 9825943 A	18-06-1998	DE 19651560 A	18-06-1998
		AU 5661298 A	03-07-1998
WO 9740385 A	30-10-1997	KEINE	
WO 9613522 A	09-05-1996	AU 4197396 A	23-05-1996
		EP 0789715 A	20-08-1997
		JP 10508304 T	18-08-1998
		US 5718915 A	17-02-1998
WO 9320242 A	14-10-1993	US 5573905 A	12-11-1996
		AU 685050 B	15-01-1998
		AU 3944993 A	08-11-1993
		CA 2132103 A	14-10-1993
		EP 0643778 A	22-03-1995
		JP 7505530 T	22-06-1995
		US 5723598 A	03-03-1998
WO 9507289 A	16-03-1995	US 5484909 A	16-01-1996
		EP 0674650 A	04-10-1995
		JP 8503620 T	23-04-1996
		US 5705339 A	06-01-1998
WO 9640991 A	19-12-1996	US 5789163 A	04-08-1998
		AU 5871396 A	30-12-1996
		EP 0832291 A	01-04-1998
WO 9727317 A	31-07-1997	AU 2253397 A	20-08-1997
		EP 0880598 A	02-12-1998
US 5188937 A	23-02-1993	KEINE	
WO 9504136 A	09-02-1995	AU 7408094 A	28-02-1995
		CA 2166871 A	09-02-1995
		EP 0711341 A	15-05-1996
		JP 9501767 T	18-02-1997
EP 0543550 A	26-05-1993	JP 5322817 A	07-12-1993
		US 5532128 A	02-07-1996
		US 5670322 A	23-09-1997
		US 5653939 A	05-08-1997
		US 5846708 A	08-12-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**